

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-153692

(P2003-153692A)

(43) 公開日 平成15年5月27日 (2003.5.27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	デフォルト* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 5 書面 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2002-127623(P2002-127623)

(22) 出願日 平成14年3月25日 (2002.3.25)

(31) 優先権主張番号 特願2001-317473(P2001-317473)

(32) 優先日 平成13年9月7日 (2001.9.7)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 598163035

桂 進司

静岡県湖西市鷺津2860番地の28

(71) 出願人 000193531

水野 彰

愛知県名古屋市中区金山一丁目4番2号

(アーバンラフレ金山1202号)

(72) 発明者 水野 彰

愛知県名古屋市中区金山一丁目4番2号

(アーバンラフレ金山1202号)

(72) 発明者 桂 進司

静岡県湖西市鷺津2860-28

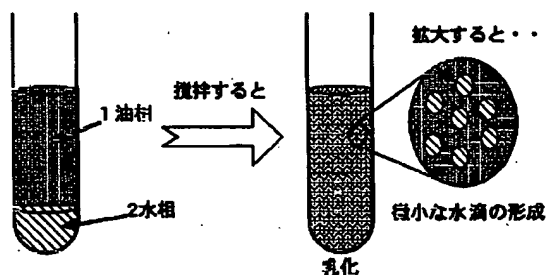
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸増幅方法

(57) 【要約】

【課題】 1分子～数分子の極微量の鋳型核酸を対象とした核酸増幅反応を実現するために、これまでに様々な手法が試みられている。しかしながら、これまでに行われてきた手法は装置等にコストがかかったり、確実性に欠けたり、十分な増幅が行われなかったりといった問題があった。

【解決手段】 本発明は、油中に形成された反応溶液の微小液滴中で核酸増幅を行う第一のステップと、その後前記微小液滴を集合させて再び増幅を行う第二のステップとを含む核酸増幅方法を提供する。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸試料を核酸増幅する方法であって、油中に形成された反応溶液の微小液滴中で前記核酸増幅を行う第一のステップと、その後前記微小液滴を集合させて再び増幅を行う第二のステップとを含む核酸増幅方法。

【請求項2】 前記第一のステップにおいて、油中に反応溶液を導入し攪拌してWater-in-Oil (W/O) エマルジョン化することにより微小反応液滴を形成する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記核酸試料はDNAであり、前記核酸増幅反応はPCR反応であることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 前記核酸試料はRNAであり、前記核酸増幅反応はRT-PCRである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】 核酸試料を核酸増幅する装置であって、油中に形成された反応溶液の微小液滴中で前記核酸増幅を行う手段と、前記微小液滴を集合させる手段と、前記微小液滴を集合して得た反応溶液層中で増幅を行う手段とを備えてなる核酸増幅装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、極微量核酸試料を増幅する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、生化学反応を行う際に、試料の微量化、反応の効率化を実現することが重要な課題となっている。

【0003】 特に、核酸増幅法による、DNA、RNA等核酸の分析は診断医療、医薬品開発、法医学、感染症検査などの分野に利用されており、これらの分野では試料の核酸が極微量しか手に入らない状況があること、分析コストの面から試料や反応溶液の微量化が求められていることなどから、極微量の核酸を対象とした核酸増幅法の開発が望まれる。

【0004】 極微量の核酸試料から増幅反応を行わせる手段としては、マイクロデバイスを用いる方法が数多く試みられているが、この方法では、容器表面へ核酸分子が付着する可能性が増加し、1分子レベルの極微量核酸試料を取り扱う場合には大きな問題となるとともに、反応生成物の検出に特別な性能を持つ検出・解析装置が必要になるため、初期コストが高価になる場合が多い。

【0005】 一方で、より簡便に、より確実に1分子レベルの極微量核酸試料を増幅する手段として、微小液滴を反応場とした方法がいくつか提供されている。

【0006】 特許第3120453号では、基板表面に被覆された油層中にインクジェット法を用いて微小反応液滴を形成し、PCR等の反応を行う方法が記載されている。このような方法では、局所的な核酸試料濃度が非

常に高くなるために反応効率は上がり、また、核酸試料の反応容器壁への付着を抑制することが可能になった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら上記のような方法では、微小液滴中に含まれる反応材料（例えばPCR反応の場合プライマー等を指す）の量が少ないことが問題となる。具体的に例を挙げると、微小反応液滴中でPCRを行った場合、反応溶液には試料の核酸とプライマー等の反応材料が含まれるが、熱サイクルを繰り返すうちに反応液滴中のプライマー等が消費され尽くして反応がそれ以上進まず、十分な量まで核酸増幅が行われないという不具合が生じる。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、本発明に想到した。即ち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 核酸試料を核酸増幅する方法であって、油中に形成された反応溶液の微小液滴中で前記核酸増幅を行う第一のステップと、その後前記微小液滴を集合させて再び増幅を行う第二のステップとを含む核酸増幅方法。

(2) 前記第一のステップにおいて、油中に反応溶液を導入し攪拌してWater-in-Oil (W/O) エマルジョン化することにより微小反応液滴を形成する

(1)に記載の方法。

(3) 前記核酸試料はDNAであり、前記核酸増幅反応はPCR反応であることを特徴とする(1)または(2)に記載の方法。

(4) 前記核酸試料はRNAであり、前記核酸増幅反応はRT-PCRである、(1)または(2)に記載の方法。

(5) 核酸試料を核酸増幅する装置であって、油中に形成された反応溶液の微小液滴中で前記核酸増幅を行う手段と、前記微小液滴を集合させる手段と、集合された微小液滴中で増幅を行う手段とを備えてなる核酸増幅装置。

【0009】 本発明の方法では、第一段階において油中に形成した微小反応液滴中である程度増幅反応を行うと、核酸が導入されて反応が進行した液滴中では反応材料が欠乏し、その一方で反応が行われなかった液滴中では反応材料は消費されずに残っている。そこで、この状態から、第二段階として液滴を集合させることにより、残った材料を用いてさらに反応を進めることが可能になる。

【0010】 例えば該反応がPCRの場合、第一段階では微小液滴を反応場とすることで1～数分子の極微量DNA試料でも効率的にPCR増幅を行うことができる。ここで、DNAが導入された液滴内ではPCR増幅が進んだ結果プライマー等のPCR基質が欠乏し、DNAが導入されなかった液滴内では反応が起こらないためPCR基質が残る。そこで、液滴を集合させることにより、

第一段階である程度増幅したDNAに対して、残ったPCR基質を利用して、さらに第二段階の反応が進むことになる(図1)。

【0011】本発明の方法は、様々な化学・生化学反応に広く利用可能である。具体的には、PCR法、RT-PCR法、NASBA法、3SR法、SDA法、TMA法、CPCR法などの各種核酸増幅法に適用することでより効果を発揮する。しかしながら、核酸増幅反応以外にも、タンパク質合成反応、種々の酵素反応等に利用できる。

【0012】本発明の方法は、DNAを対象としたPCR法、RNAを対象としたRT-PCR法、または種々の酵素反応など、熱サイクルを必要とする反応にも利用可能である。

【0013】油中に微小液滴を形成する方法としては、W/Oエマルジョンを利用する方法が挙げられる。W/Oエマルジョンは油成分に水溶液成分を混合攪拌することで形成される乳化状態のことである。エマルジョン状態とは、油成分中に水溶液成分が微小な水滴となって分散している状態をいう(図2)。W/Oエマルジョンを利用することにより、特殊な装置を必要とすることなく、微小反応液滴を簡単に形成することができる。しかしながら、これ以外に細いノズルなどから油中に反応溶液を注入して液滴を作ってもよい。

【0014】油中に分散した液滴を集合させる方法として遠心分離が好適に利用される。汎用の機器を利用でき、簡易であるからである。遠心分離操作を行った結果、油-水の2層が形成されることとなる。液滴を集合する方法は遠心分離に限られるものではなく、振とうなど他の方法を採用することができる。

【0015】本発明に使用する油としては、水の溶解度が小さい、親水性がある、化学的、熱的に不活性である、等の性質を満たすものが使用される。一般的には、ミネラルオイル、シリコンオイル、イマージョンオイル、ナタネ油が使用できるが、より小さく安定した液滴を保持し、耐熱性が優れている点で、シリコンオイルが望ましい。

【0016】水溶液成分に界面活性剤(例えばTritonX-100 0.01%~1%程度)を添加してもよい。

【0017】

【発明の実施の形態】次に本発明の実施の形態について説明する。W/Oエマルジョンを利用することで汎用機器を用いて簡便に行える1分子PCR法に関して、以下に本発明の実施例を説明する。

【0018】通常のPCRの手順に従ってPCR溶液を調製する。この時、PCR溶液中に界面活性剤を添加してもよい。

【0019】次に、例えば図4のように設置した容器に、PCR溶液4を混合する。この時、マグネチックス

ターラーバー5を回転させ、油を攪拌しながらPCR溶液4を混合する。

【0020】W/Oエマルジョン状態になった溶液をPCR熱サイクル実施のための反応装置に導入できる大きさのプラスチックチューブに分注する。

【0021】PCR熱サイクルを行う。ここでのサイクル数は10~15回でよい。この時、W/Oエマルジョンによる液滴のうち鋳型DNAが導入されたものは微小な反応場となり1分子からの増幅がされる。

【0022】最初の熱サイクルが終わったら、遠心操作を行うことにより、油-水の2層に分離し、再びPCR熱サイクルを行う。このサイクル数は25~30回でよい。最初のW/Oエマルジョン状態時に鋳型DNAが入らなかった液滴中のプライマー等のPCR反応基質は熱サイクルによる消費が無いためそのまま残り、遠心操作後の反応にPCRの基質を提供する。

【0023】以下、本発明の実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0024】

【実施例1】PCRを用いて実際に行った実験を実施例として挙げる。通常のPCRの手順に従って50 μ lのPCR溶液を氷上にて調製する。このときPCR溶液には0.1%の界面活性剤(TritonX-100)が含まれている。また、鋳型DNAはpUC19DNA(宝酒造)である。反応溶液構成物はPfuTurbo DNA Polymerase(Stratagene)と同酵素に添付されたPCR緩衝液(20mM Tris-HCl、2mM MgCl₂、10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1% TritonX-100、0.1mg/ml BSA)(Stratagene)、0.2mM dNTPs(宝酒造)、プライマーは517F PRIMER1、517F PRIMER2(フナコシ)(配列番号1~2)をそれぞれ0.3 μ Mである。このプライマーによって増幅されるのはpUC19DNAのうちの522bpである。プライマーの配列番号は、配列番号1: 517F PRIMER 5' CTTGAGTCCAACCCGGTAA G3'、配列番号2: 517F PRIMER 5' GGGAGTCAGGCAACTATGG3'である。

【0025】5mlの容器に0.95mlのシリコンオイルとマグネチックスターラーバーを入れて、図4の状態にする。図4の状態でシリコンオイルを攪拌しながら、先に調製したPCR溶液を30秒ごとに10 μ lずつシリコンオイルに混合していく。全て混合したら、そのまま90秒間攪拌し続ける。この時できる液滴の大きさは直径5~10 μ mである。0.5mlのマイクロチューブ2本にエマルジョン溶液を分注し、サーマルサイクラーに導入しPCRを実行する。その条件は、95℃-5分の後、95℃-30秒、60℃-30秒、

72℃-1分を13サイクルである。

【0026】最初のPCRが終わったらチューブをサーマルサイクラーから取り出し、3000gで5分間遠心する。その後、再びPCRを行う。その条件は、95℃-3分の後、95℃-30秒、60℃-30秒、72℃-1分を25サイクルし、最後に72℃-7分である。産物の確認は各チューブから9μlずつ取り、1.2%アガロースゲル電気泳動で行った。

【0027】上記実験の結果を図5に示す。PCR増幅

ポアソン分布によって与えられる各平均個数に対してある分子数の DNA が存

在している確率

導入した DNA の平均個数	以下の分子数の DNA が存在する確率 (%)			
	0 個	1 個	2 個以上	有り
10	0.00	0.05	99.95	100.0
1	36.79	36.79	26.42	63.21
0.1	90.48	9.05	0.47	9.52
0	100	0	0	0

【0029】PCR増幅では理想的には1分子の鋳型DNAが存在すれば、増幅可能であることに留意して、図5の結果を解析すると、増幅された試料の数はポアソン分布による確率分布にほぼ忠実である。このことは、本反応系により、1分子からの増幅が行われていることを示している。

【0030】また、同反応条件でW/Oエマルジョンを用いなくてPCR増幅を行った結果を図6に示す。ここでは鋳型DNAが1000、100、10分子となるように試料を調製した。これらの試料において、熱サイクル数を増加させてもこれらの分子数からの産物は得られなかった。

【0031】これにより、本発明はW/Oエマルジョンを反応時に適用することによって1分子からの増幅が可能になることが示された。

【0032】

【実施例2】次に実際にRT-PCRを用いて行った実験を実施例として記載する。

【0033】これは、一段階式のRT-PCR法に適用される。例えば、TaKaRa社製のTaKaRa O

ne Step RNA PCR kit (AMV) の産物はλ/Hind IIIマーカーの564ベースペア付近に見られる。この実験を行う際、鋳型DNAの数を10、1、0.1、0分子となるように、反応溶液を調製している。このように鋳型DNAの希釈を行った場合、マイクロチューブ中の鋳型DNAの数の確率分布はポアソン分布に従う。その確率分布を表1に示す。

【0028】

【表1】

ne Step RNA PCR kit (AMV) を用いる。以下に同社同製品を用いてRT-PCRを本件におけるW/Oエマルジョンを用いた方法で行なった実験を記載する。

【0034】RT-PCRを行なうための試薬はTaKaRa One Step RNAPCR kit (AMV) に同梱されているものを用いた。ここで用いたプライマーの配列は各々、Control F-1 primer: d (CTGCTCGCTTCGCTACTTGA), Control R-1 primer: d (CGGCACCTGTCCTACGAGTTG) である。また、Positive Control RNA は、SP6 Promoter 流域下流にpBR322由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約1.4kbpの断片を挿入したプラスミドpSPTet3を鋳型として、SP6 RNA Polymeraseを用いてin vitro transcriptionにより合成を行なったものである（同製品説明書より抜粋）。反応溶液の組成は以下のとおりである（同製品説明書記載事項に従う）。

	添加量	最終濃度
RNase Free dH ₂ O	25 μ l	—
AMV Reverse Transcriptase XL [™]	1 μ l	5U
RNase Inhibitor	1 μ l	40U
AMV-Optimized Tag	1 μ l	5U
10 × One Step RNA PCR Buffer	5 μ l	—
dNTP Mixture	5 μ l	1mM
MgCl ₂	10 μ l	5mM
Control F-1 primer	1 μ l	0.4 μ M
Control R-1 primer	1 μ l	0.4 μ M
Positive control RNA	1 μ l	1U
total	50 μ l	—

※Life Sciences 社で製造されたもの

【0035】5mlの容器に0.95mlのシリコーンオイルとマグネチックスターラーを入れて、図4の状態にする。図4の状態ですりコーンオイルを攪拌しながら、先に調製したPCR溶液を30秒ごとに10 μ lずつシリコーンオイルに混合していく。全て混合したら、そのまま90秒間攪拌し続ける。0.2mlのマイクロチューブ8本にエマルジョン溶液を分注し、サーマルサイクラーに導入しRT-PCRを実行する。その条件は、50℃-15分、94℃-3分の後、94℃-30秒、60℃-30秒、72℃-1.5分を13サイクルである。ここで、最初の50℃-15分の過程は最初のDNA一本鎖合成 (First strand synthesis) 行程である。

【0036】最初のPCRが終わったらチューブをサーマルサイクラーから取り出し、3000gで3分間遠心する。その後、再びPCRを行う。その条件は、94℃-3分の後、94℃-30秒、60℃-30秒、72℃-1.5分を28サイクルし、最後に72℃-7分である。産物の確認は各チューブから4 μ lずつ取り、1.2%アガロースゲル電気泳動で行った。

【0037】まず、W/Oエマルジョンを使った場合と使わなかった場合の比較実験の結果を図7に示す。ControlはW/Oエマルジョンを導入しなかったものである。この図7よりW/Oエマルジョンを導入したことによる反応の阻害が見られず、逆にControlに比べてスミアのバンドが小さいことから反応の特異性の向上が確認される。

【0038】また、鋳型RNA (Positive Control RNA) の量を1反応あたり5分子になるように反応を行なった結果が図8である。図8の結果に産物が示されていることから、このW/Oエマルジ

ンを用いたPCRは1段階RT-PCRに有効であることが示された。

【0039】一般に1段階のRT-PCRは2段階のRT-PCRに比べて簡便である代わりに感度が比較的悪いと言われている。しかしながら、W/Oエマルジョンを用いた場合、こういった欠点が解消されていると考えられる。

【0040】RNAからDNAへの逆転写もW/Oエマルジョンが与える微小液滴中で行なうことで、確実かつ特異的にRNAの逆転写が実行されていることがその理由だと考えられる。

【0041】このように簡便な1段階RT-PCRにW/Oエマルジョンを適用することで、その欠点が改善できることが示された。この手法はHIVウィルスなどのRNAウィルスの検出限界 (ウィンド・ピリオド) を飛躍的に短縮することが期待される。

【0042】

【発明の効果】本発明の方法を用いることで、極微量核酸試料を対象として容易に核酸増幅反応を進行させることが可能である。反応を二段階で行うことにより、微小反応液滴中の反応材料の欠乏に起因する不具合を解決し、十分な量の増幅反応産物を得ることができる。

【0043】本発明の方法でPCRやRT-PCRを行うと、その産物は、ゲル電気泳動ではっきりと確認できるほどの高増幅率を示している。本発明の方法は効率的かつ確実に核酸増幅を行えることから、希少DNAのシーケンシングの前段階などの少ない分子のPCR増幅、感染初期のウイルス検査などに汎用的に応用されることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はWater-in-Oil (W/O) エ

BEST AVAILABLE COPY

マルジョンの概略を示す図である。

【図2】図2は本発明による方法の実施の形態の概略を示す図である。

【図3】図3は、極微小反応液を微小な液滴に分散することで、高濃度の反応液を作ることができることを示す図である。

【図4】図4は本発明による方法の実施の形態の例を示す図である。

【図5】(A) (B) 図5 (A) は本発明の方法を用いて行った1分子PCRの電気泳動の結果を示す図である。(B) は個々のレーンの説明図である。

【図6】(A) (B) 図6 (A) は本発明の方法を用い

ずに本発明と比較するために行った通序のPCR法の産物を電気泳動で解析した結果を示す図である。(B) は個々のレーンの説明図である。

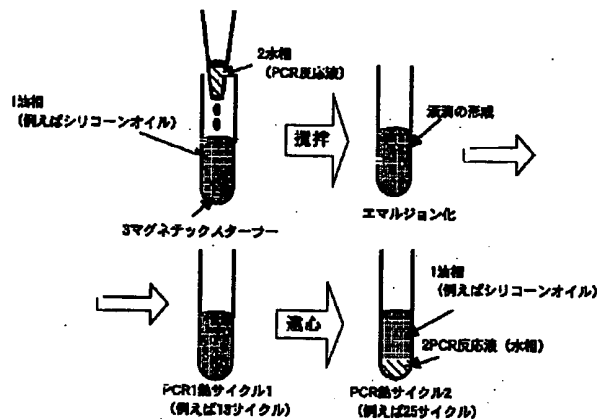
【図7】図7は本発明の方法を用いたRT-PCR法の産物を通序のPCR法の産物と比較した電気泳動の結果を示す図である。

【図8】図8は本発明の方法を用いて行ったRT-PCRの電気泳動の結果を示す図である。

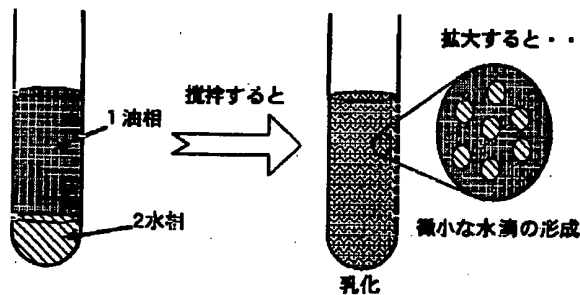
【符号の説明】

1は油相 2は水相 3はマグネチックスターラーバー 4はマグネチックスターラー 5は水と水

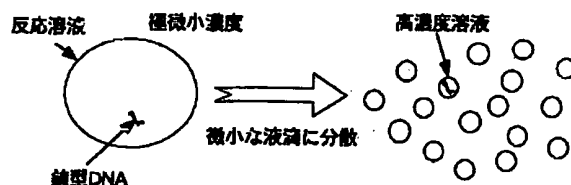
【図1】



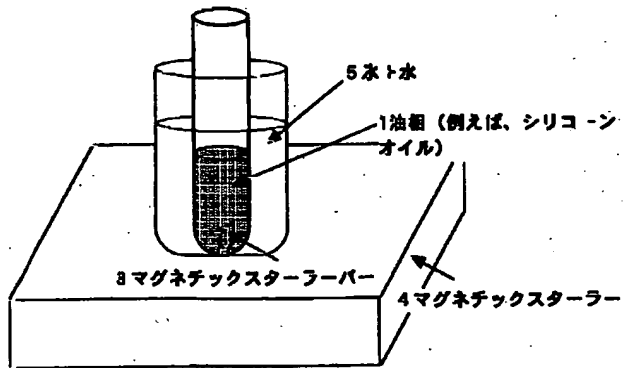
【図2】



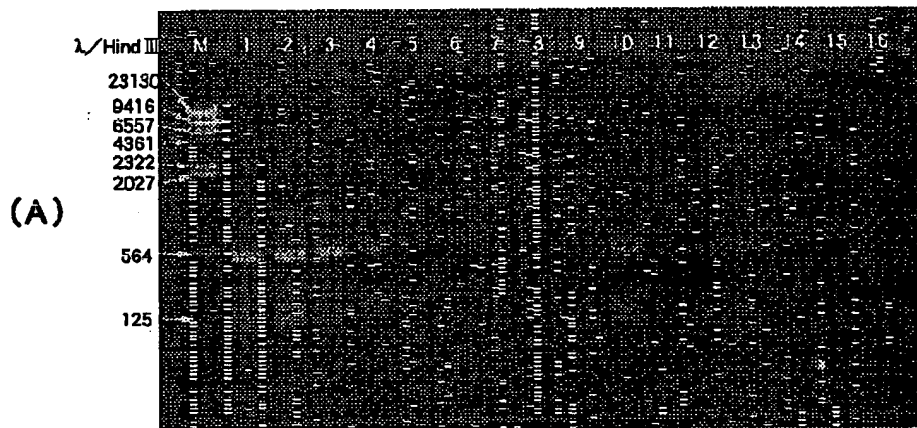
【図3】



【図4】



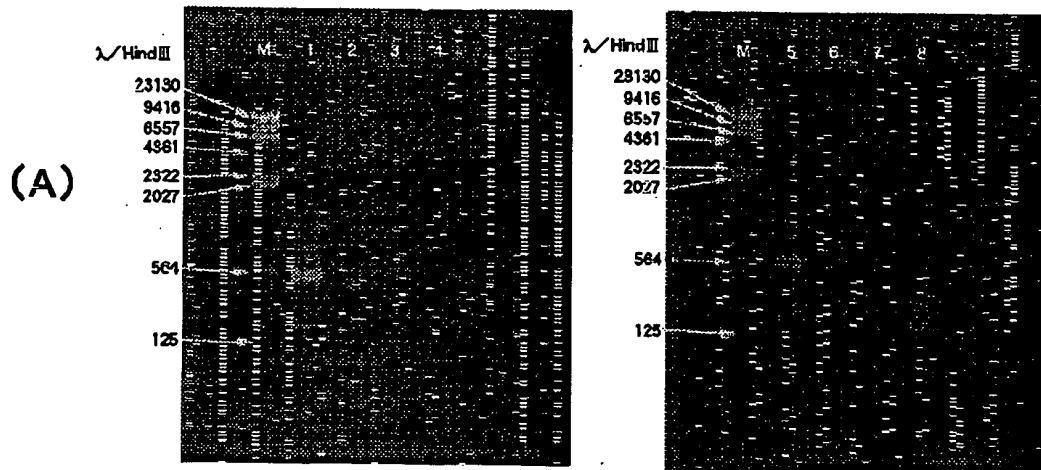
【図5】



(B)

レーン番号	鋸型DNAの数
M	-
1, 2	10
3~6	1
7~15	0.1
16	0

【図6】



(B)

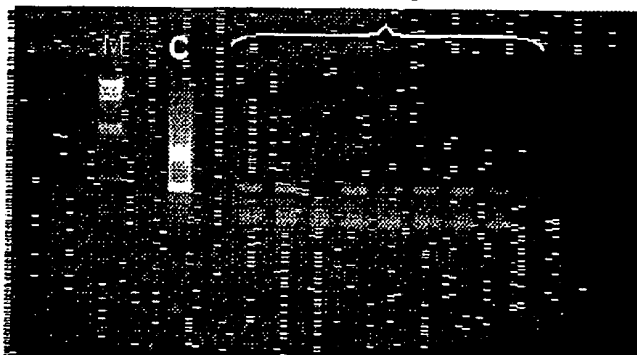
レーン番号	試料	PCRサイクル数
M	サイズマーカー (λ/Hind III)	—
1, 5	コントロール	25
2	鋳型DNA1000分子	25
3	鋳型DNA100分子	
4	鋳型DNA10分子	
6	鋳型DNA1000分子	
7	鋳型DNA100分子	70
8	鋳型DNA10分子	

【図8】

M; λ/Hind III

C; control (objective product size; 462bp)

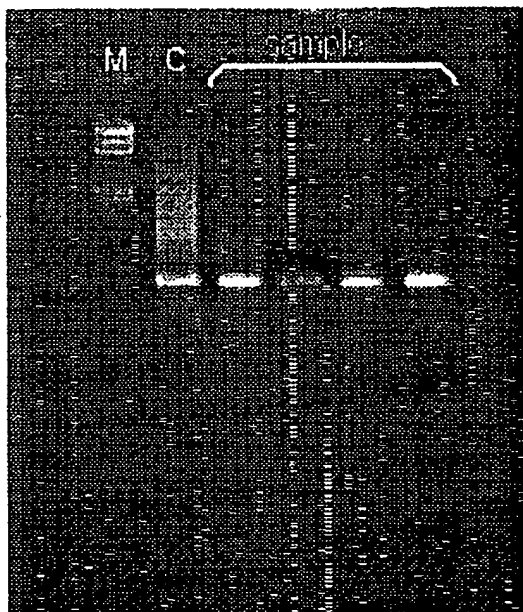
sample



【図7】

M; λ HindIII

C; control (objective product size; 462bp)



フロントページの続き

(72)発明者 中野 道彦
愛知県豊橋市弥生町字東豊和65 (彩季館
428号)

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 HA20
4B029 AA23 BB20 DA10 DB19 DF10

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)